

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut  
Bioorgaanilise keemia õppetool

JUULI NÕGES

**TSÜKLILISE ADENOSIINMONOFOSFAADI (cAMP)  
BIOSENSORI KOHANDAMINE  $G_i$ -SEOTUD  
RETSEPTORITE LIGANDIDE ISELOOMUSTMISEKS**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Olga Mazina, MSc

Tartu 2013

# SISUKORD

<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>5</b>
Sissejuhatus .....	5
Signaaliülekanne G-valguga seotud retseptorite kaudu .....	6
Heterotrimeersete G-valkude struktuur ja aktivatsioon .....	6
Adenülaadi tsüklaas .....	8
Forskolin .....	9
Raku sekundaarne virgatsaine cAMP .....	10
Dopamiini retseptorid .....	11
cAMP taseme määramise meetodid .....	14
FRET-il põhinevate cAMP biosensorite arendus .....	16
Epac valgul põhinevad biosensorid .....	16
cAMP biosensorite BacMam ekspressioonisüsteem .....	19
<b>EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>21</b>
Materjalid ja aparatuur .....	21
HEK293 rakuliini kasvatamine .....	22
Sensorvalgu ekspresseerimine HEK293 rakuliinis .....	22
Funktsionaalsed katsed .....	22
Andmete töötlemine .....	23
<b>TULEMUSED JA ARUTELU .....</b>	<b>24</b>
G <sub>i</sub> -seotud retseptorite vahendatud cAMP taseme muutuste määramine elusrakkudes .....	24
Katsetingimuste optimeerimine .....	24
Epac2-camps sensori valideerimine .....	25
1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilise aktiivsuse määramine .....	26
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>34</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>35</b>
<b>TÄNUAVALDUSED .....</b>	<b>36</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS .....</b>	<b>37</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

7-TM	-	seitsme transmembraanne
AC	-	adenülaadi tsüklaas
ADHD	-	tähelepanupuudus- ja hüperaktiivsushäire ( <i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i> )
AMP	-	adenosiin-5'-monofosfaat
APO	-	apomorfiin
ATP	-	adenosiin-5'-trifosfaat
BacMam	-	ekspressioonisüsteem, mis võimaldab imetajarakkudes ekspresseerida bakuloviiruse geenoomi sisendatud rekombinantset geenijärjestust
cAMP	-	tsükliline adenosiin-3'-5'-monofosfaat
CFP	-	helesinine fluorestsentsvalk ( <i>Cyan Fluorescent Protein</i> )
cGMP	-	tsükliline guanosiin-3'-5'-monofosfaat
CHO	-	hiina hamstri munasari ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
CNBD	-	tsüklilisi nukleotiide siduv domeen
cNGC	-	tsükliliste nukleotiidide poolt reguleeritudioonkanal
CRE	-	cAMP vastus-element ( <i>cAMP Response Element</i> )
DA	-	3-hüdroksütüramiin; dopamiin
DAR	-	dopamiini retseptor
DNA	-	desoksüribonukleiinhape
DMEM	-	Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DPBS	-	Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )
EC <sub>50</sub>	-	ühendi kontsentratsioon, mille juures on saavutatud pool maksimaalsest efektist
Epac	-	cAMP efektorvalk ( <i>Exchange protein directly activated by cAMP</i> )
FBS	-	veiseloote seerum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FI	-	fluorestsentsi intensiivsus
Fl	-	fluoretsiin

## KASUTATUD LÜHENDID

FLIM	-	fluorestsentsi eluea määramise mikroskoopia ( <i>Fluorescence Lifetime Imaging</i> )
FRET	-	Försteri resonantsenergia ülekanne
G418	-	genetitsiin
GDP	-	guanosiin-5'-difosfaat
GTP	-	guanosiin-5'-trifosfaat
GPCR	-	G-valguga seotud retseptor
G-valk	-	guaniinnukleotiide siduv regulaatorvalk
HEK293	-	inimese embrüo neerurakud ( <i>Human Embryonic 293 Kidney cells</i> )
IC <sub>50</sub>	-	inhibiitori kontsentratsioon, mille juures on blokeeritud 50% ligandi seostumisest
IP <sub>3</sub>	-	inositool 1,4,5-trifosfaat
K <sub>i</sub>	-	inhibiitori dissotsiatsiooni tasakaalukonstant
MOI	-	nakatuskordsus ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
mRNA	-	informatsiooni-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NaBu	-	naatriumbutanaat
PDE	-	fosfodiesteras
pEC <sub>50</sub>	-	negatiivne logaritm EC <sub>50</sub> -st
PIP <sub>2</sub>	-	fosfatidüülinositool 4,5-bifosfaat
PKA	-	cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A
Rh	-	rodamiin
Rho-GEF	-	GTPaaside Rho perekonda kuuluvad guaniinnukleotiidide vahetusfaktorid
RIA	-	radioimmuunanalüüs
RNA	-	ribonukleinhape
RPMI	-	rakusööde ( <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> )
SEM	-	keskmise standardviga ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
YFP	-	kollane fluorestsentsvalk ( <i>Yellow Fluorescent Protein</i> )

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## Sissejuhatus

Rakkudevahelise signaaliülekanne toimimisel on väga tähtsal kohal G-valgud ja nendega seotud retseptorid (GPCR). GPCR-id on suurim rakupinna retseptorite perekond, mis vahendavad suurel hulgal erinevaid rakust väljaspoolt tulevaid signaale raku sisse. Kuna mitmed haigused on seotud nende retseptorite väärtalitlusega, siis on GPCR-id tänapäeva ravimitööstuses üheks oluliseimaks ravimmärklauaks. Dopamiini retseptorid, mis samuti GPCR-de alla kuuluvad, on tänapäeval üheks väga oluliseks ravimsihtmärgiks, sest talitlushäired dopaminergilises süsteemis on mitmete haiguste nagu Parkinsoni tõve, skisofreenia ja Tourette'i sündroomi põhjustajaks.

Kuna nendele haigustele pole veel leitud piisavalt tõhusaid ja kõrvalmõjudeta ravimeid, siis on palju tähelepanu pööratud uute ja ohutute ühendite väljatöötamiseks, mis dopaminergilisele süsteemile mõju avaldaksid. Kuna GPCR-de näol on tegemist keerulise süsteemiga, mille aktiveerumisel käivituvad mitmed erinevad signaalirajad, siis peab ainete mõju uurimiseks valitud meetod olema piisavalt tundlik ka väga väikestele muutustele raku keemilises koostises.

Kui varem olid retseptor-ligand vastastikmõjude iseloomustamiseks laialdaselt kasutusel erinevad radioaktiivsusel põhinevad meetodid, siis tänapäeval eelistatakse aina enam fluorestsentsil põhinevaid meetodeid tänu nende ohutusele ja suuremale tundlikkusele. Seetõttu on ka käesolevas töös bioloogiliselt aktiivsete ainete iseloomustamiseks radioaktiivsete meetodite asemel võetud kasututusele fluorestsensil põhinev sensor.

Käesoleva töö eesmärgiks oli tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) efektorvalgul (Epac) põhineva biosensori kohandamine dopamiin D2 ja D3 retseptorsüsteemidele ning selle abil 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilise aktiivsuse määramine dopamiin D2 ja D3 retseptori alatüüpidele.

## **Signaaliülekanne G-valguga seotud retseptorite kaudu**

Rakud saavad informatsiooni edastada nii elektriliselt kui ka keemiliselt. Närvirakkudes kandub signaal mööda aksonit (närviraku jätke) edasi elektriliselt. Aksoni membraan on tänu ionide ebavõrdsele jaotusele erineval pool membraani polariseeritud. Signaali saabumisel avanevad pinge-sõltuvadioonkanalid, mistõttu ionide jaotus ühtlustub ja membraan depolariseerub. See depolarisatsioonilaine kandub mööda aksonit edasi närviraku teise otsa, kus saabunud signaal keemiliselt järgmisele rakule edasi antakse. Signaali vastuvõtjaks on raku membraanil olevad retseptorid, mis võtavad vastu väljastpoolt rakku tuleva signaali ning kutsuvad esile muutuse raku sees. (Siegel *et al.* 2012) Suurim signaaliülekandega seotud membraansete valkude perekond on G-valguga seotud retseptorid (GPCR). G-valguga seotud retseptoreid leidub eukariootides, sealhulgas pärmis, taimedes, kaelusviburlastes ja loomades (Marinissen ja Gutkind 2001).

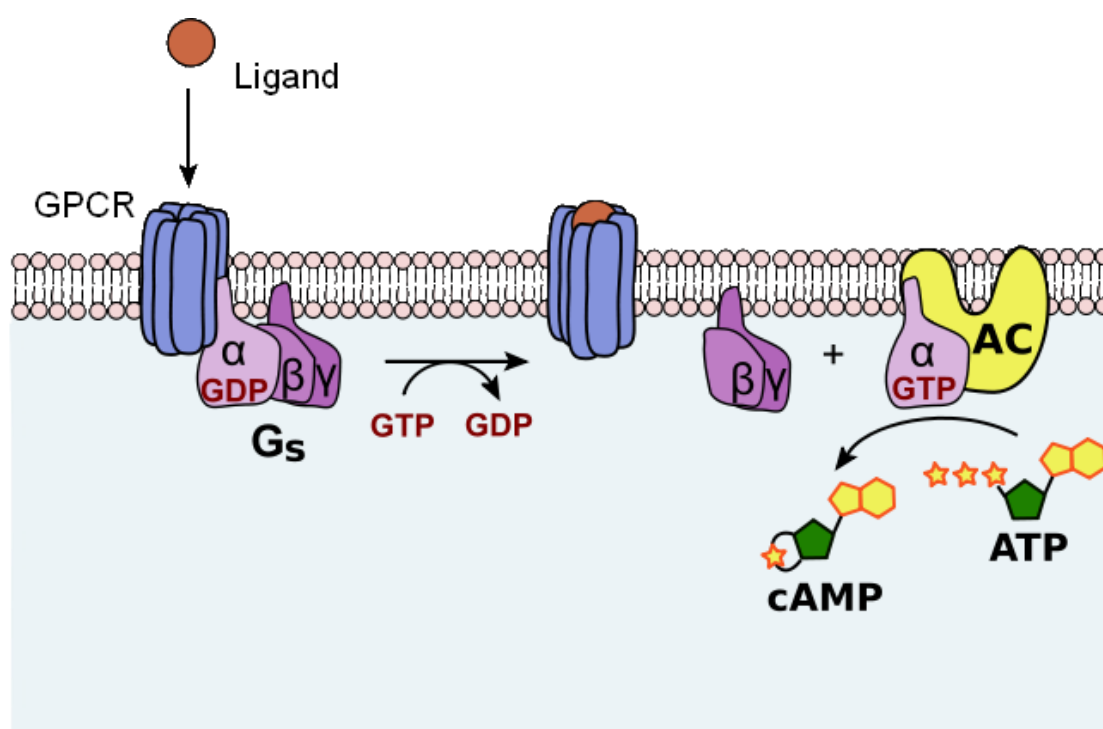
GPCR-id mängivad olulist rolli nägemisel, maitsmisel ja haistmisel ning samuti vahendavad nad paljude hormoonide, ionide ja virgatsainete signaale. GPCR-id on ravimmärklauaks üle pooltele turul olevatele retseptiravimitele (Wu 2010).

GPCR on  $\alpha$ -helikaalne seitsme transmembraanne (7-TM) valk. Retseptori N-ots asub rakust väljaspool ning C-ots raku sees. Seitse membraani läbivat heeliksi on omavahel seotud kuue aasaga, millest kolm asuvad raku sees ja kolm rakust väljas. Rakust väljapoole jäävad aasad sisaldavad kahte tsüsteiinijääki, mis moodustavad omavahel disulfiidsideme ja seega stabiliseerivad retseptori struktuuri. GPCR-id on seotud rakumembraani sisemises kihis asuva heterotrimeerse G-valguga (joonis 1). Oma nime on G-valgud saanud selle järgi, et nad seovad guaniinnukleotiide: puhkeolekus guanosiindifosfaati (GDP), mis retseptori aktiveerimisel asendub guanosiintrifosfaadiga (GTP). (Siegel *et al.* 2012)

### **Heterotrimeersete G-valkude struktuur ja aktivatsioon**

GPCR-dega seotud heterotrimeersed G-valkud koosnevad kolmest alaühikust: alfa ( $\alpha$ ), beeta ( $\beta$ ) ja gamma ( $\gamma$ ) (joonis 1). Beeta ja gamma alaühikud moodustavad dimeerse kompleksi. Alfa alaühikut on mitu erinevat tüüpi, mille järgi G-valke ka liigitatakse. G-valgu alfa alaühikuid võib põhiliselt jagada neljaks.  $G_q\alpha$ -alaühik

reguleerib ensüümi fosfolipaaas  $C_\beta$ , mis omakorda reguleerib rakusiseste signaalmolekulide, nagu fosfatidüülinositol 4,5-bifosfaat ( $PIP_2$ ), inositol 1,4,5-trifosfaat ( $IP_3$ ) ja  $Ca^{2+}$ , tootmist.  $G_{12/13}\alpha$ -alaühik aktiveerib väikeste GTPaaside Rho perekonda kuuluvaid guaniinnukleotiidide vahetusfaktoreid (Rho-GEF).  $G_s\alpha$ -alaühik stimuleerib ensüümi adenülaadi tsüklaas (AC) (joonis 1), mistõttu tõuseb tsüklilise adenosiin-3'-5'-monofosfaadi (cAMP) kontsentratsioon ning  $G_i\alpha$ -alaühik inhibeerib adenülaadi tsüklaasi ning alandab cAMP kontsentratsiooni rakus. Erinevate  $\alpha$ -alaühikute molekulmass jääb vahemikku 38-52 kDa. Samuti on leitud 5 erinevat  $\beta$ -alaühikut ja 11 erinevat  $\gamma$ -alaühikut. (Siegel *et al.* 2012)



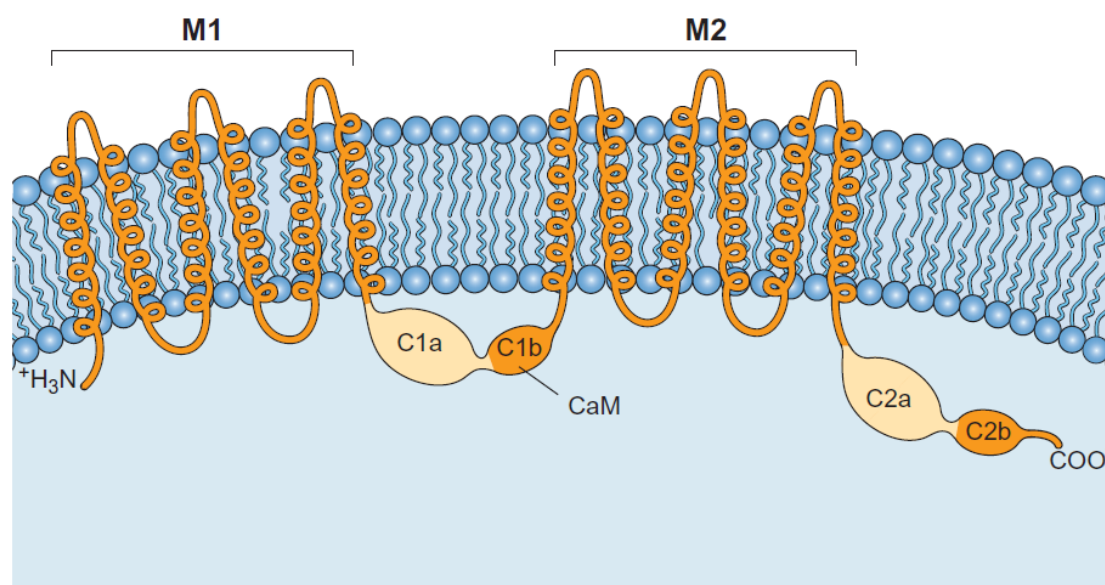
**Joonis 1.**  $G_s$ -valguga seotud retseptori aktivatsiooni skeem. Puhkeolekus G-valk koosneb  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikust ning  $\alpha$ -alaühik seob guanosiindifosfaati (GDP). Ligandi seostumisel retseptorile toimub muutus retseptori konformatsioonis. Seetõttu dissotsieerub  $\alpha$ -alaühikult GDP ning see asendub guanosiintrifosfaadiga (GTP) aktiveerides sellega G-valgu.  $\alpha$ -alaühik ning  $\beta\gamma$ -dimeer eralduvad üksteisest ja retseptorist ning on võimelised mõjutama erinevaid efektormolekule. Sellel skeemil aktiveerib  $\alpha$ -alaühik adenülaadi tsüklaasi (AC), mis toodab adenosiin-5'-trifosfaadist (ATP) tsüklilist adenosinmonofosfaati (cAMP). Kohandatud. (Wikimedia Commons).

Puhkeolekus G-valk koosneb omavahel seotud  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikust, mis on nõrgalt seotud GPCR-ga ning kus  $\alpha$ -alaühik on seotud GDP-ga. Ligandi seostumisel GPCR-ga muutub retseptori konformatsioon. See omakorda tekitab konformatsioonilise muutuse G-valgu  $\alpha$ -alaühikus. Selle tulemusena seondub  $\alpha$ -alaühik retseptoriga ja väheneb  $\alpha$ -alaühiku afiinsus GDP-le. GDP dissotsieerub ja

selle asemel seondub  $\alpha$ -alaühikuga GTP, mille kontsentratsioon on rakus märksa suurem kui GDP oma. GTP seostumine põhjustab  $\beta\gamma$ -kompleksi eraldumist  $\alpha$ -alaühikust ning ka G-valgu eraldumist retseptorist. Selle tulemusena tekib kaks bioloogiliselt aktiivset kompleksi, GTP-ga seotud  $\alpha$ -alaühik ja  $\beta\gamma$ -kompleks, mis saavad rakus liikuda ja mõjutada mitmeid erinevaid ülalloetletud efektermolekule (joonis 1). Aktiveeritud G-valk naaseb puhkeolekusse, kui ligand eraldub retseptorilt,  $\alpha$ -alaühik, oma loomupärase ensümaatilise aktiivsuse kaudu, hüdrolüüsib GTP tagasi GDP-ks ja kõik kolm G-valgu alaühikut moodustavad taas heterotrimeerse kompleksi. (Siegel *et al.* 2012)

## Adenülaadi tsüklaas

Adenülaadi tsüklaas on rakumembraanil asuv ensüüm, mis katalüüsib cAMP ja pürofosfaadi teket adenosiintrifosfaadist (ATP). Selleks reaktsiooniks vajaminev energia tuleb katiooniga (tavaliselt  $Mg^{2+}$ ) seotud ATP molekulilt. Reaktsiooni käigus tekkinud cAMP on sekundaarne virgatsaine, mis mõjutab signaali edasist kulgu mitmete rakuliste efektorvalkude kaudu. (Siegel *et al.* 2012)



**Joonis 2.** Rakumembraani läbiva adenülaadi tsüklaasi (AC) skeem. AC koosneb kahest hüdrofoobsest osast (M1 ja M2), mis mõlemad sisaldavad kuus transmembraansest osa ning kahest hüdrofiilsest katalüütilisest domeenist (C1 ja C2). (Siegel *et al.* 2012)

AC koosneb kahest hüdrofoobsest osast, mis mõlemad läbivad membraani kuus korda ning kahest vähem hüdrofoobsest osast, mis jäävad raku sisse ning on

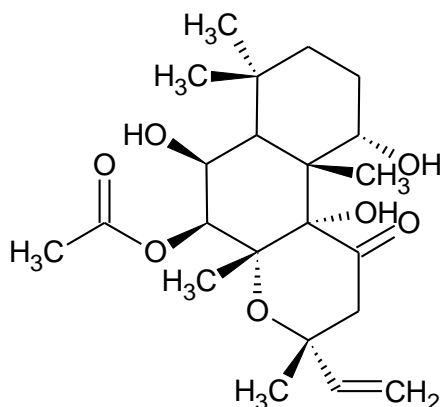


seotud cAMP katalüüsiga (joonis 2). G-valgu  $\alpha$ -alaühik seostub nii C1 kui C2 osaga, kuid põhiliselt C1 osaga. (Siegel *et al.* 2012)

Adenülaadi tsüklaasid on jagatud kuute rühma, millest eukariootsetes organismides leidub vaid III rühma esindajaid (Kamenetsky *et al.* 2006). III rühmas on erinevaid adenülaadi tsüklaase kokku kümme ning nad on jagatud kahte perekonda: esimene koosneb üheksast transmembraansest AC-st (AC1-9) ning teine ühest lahustuvast AC-st (sAC). Membraansed AC-id on omakorda jagatud nelja rühma. Esimesse AC-ide rühma kuuluvad AC1, 3 ja 8. Neid aktiveerib nii  $G_s\alpha$ -alaühik kui  $Ca^{2+}$ /kalmoduliin. Teisse rühma kuuluvad AC2, 4 ja 7. Neid ensüüme ei mõjuta  $Ca^{2+}$ /kalmoduliini tase, vaid neid aktiveerib  $\beta\gamma$ -dimeer. Kolmandasse AC rühma kuuluvad AC5 ja 6. Nad aktiveeruvad  $G_s\alpha$ -alaühiku toimetel ning neid inhibeerivad  $G_i\alpha$ -alaühik ja  $Ca^{2+}$ . Kalmoduliin selle rühma AC-e ei mõjuta. AC5 ja AC6 on unikaalsed, sest neid inhibeerib  $Ca^{2+}$  ka madalal kontsentratsioonil (0.2-0.6  $\mu M$ ). Teiste AC rühmade inhibeerimiseks peab  $Ca^{2+}$  kontsentratsioon jääma vahemikku 10-25  $\mu M$ . Neljandasse rühma kuulub ainsana AC9, mis erineb teistest transmembraansetest AC-st selle poolest, et seda ei mõjuta otseselt  $G_i\alpha$ -alaühik ega iooniline või kalmoduliiniga seotud kaltsium. (Siegel *et al.* 2012)

## Forskolin

Kaheksat transmembraanset adenülaadi tsüklaasi (AC1-8) on võimalik otseselt stimuleerida ühendiga nimega forskolin (joonis 3). Lahustuvat AC-i ja membraanset AC9 vormi forskolin ei mõjuta (Siegel *et al.* 2012).

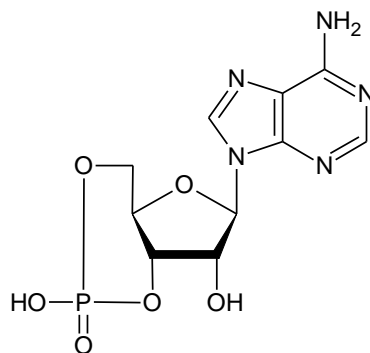


**Joonis 3.** Forskolini struktuur.

Forskolin on looduslik diterpeen, mida saadakse taime *Coleus forskohlii* juurest. See on rasvlahustuv aine, mis on võimeline läbima rakumembraani (Wagh *et al.* 2012). Forskolin mõjub otse AC-le ning see reaktsioon on kiire ning pöörduv. Kristallograafilised uuringud on näidanud, et forskolin seondub AC sidumisdomeenide C1 ja C2-ga ning see seostub ATP sidumiskoha vastasesse sidumiskohta. Forskolin seob C1 ja C2 sidumisdomeenid omavahel vesiniksidemete ja hüdrofoobsete vastastikmõjude kaudu, tõstes seeläbi AC ensümaatilist aktiivsust (Pavan *et al.* 2009). Seega forskolin tõstab cAMP kontsentratsiooni rakus G-valku aktiveerimata. Seda efekti kasutatakse sageli  $G_i$ -süsteemi uurimisel (ka käesolevas töös), kus mõõdetakse cAMP kontsentratsiooni vähenemist rakus ning milleks tuleb cAMP taset kõigepealt forskoliniga tõsta.

## Raku sekundaarne virgatsaine cAMP

Tsükliline adenosiin-3'-5'-monofosfaat ehk cAMP (joonis 4) on 1958. aastal Sutherland ja Ralli poolt avastatud sekundaarne virgatsaine. Sekundaarne seepärast, et see võimendab väljastpoolt rakku tuleva primaarse virgatsaine poolt toodetud signaali ning suunab erinevate efektormolekulide kaudu signaali edasist kulgu. cAMP, nagu ka tsükliline guanosiinmonofosfaat (cGMP),  $IP_3$  ja  $Ca^{2+}$ , on hüdrofiilne, kuid on olemas ka hüdrofoobseid (nt diatsüülgütserool ja fosfatidüülinositol) ja gaasilisi (nt NO ja CO) sekundaarseid virgatsaineid. Signaali edasikandmise kõrval on sekundaarsed virgatsained ka olulised signaali võimendajad, seega võib ühe ligandi molekuli seostumine retseptorile tuua kaasa suuri muutusi raku sees. Enamik sekundaarse virgatsaine molekulidest on väikesed, et nad saaksid kiiresti läbi tsütoplasma difundeeruda ja efektormolekulide kaudu signaali edasi anda. (Kimball 2011, Cooper 2013)



**Joonis 4.** Tsüklilise adenosiin-3'-5'-monofosfaadi (cAMP) struktuur

cAMP tasakaalu rakus mõjutavad kaks ensüümide perekonda: AC-id ja fosfodiesterasid (PDE). cAMP toodetakse ATP-st AC poolt ning lagundatakse PDE poolt adenosin-5'-monofosfaadiks (AMP). Mõlemaks reaktsiooniks on tarvis  $Mg^{2+}$  molekuli. (Siegel *et al.* 2012)

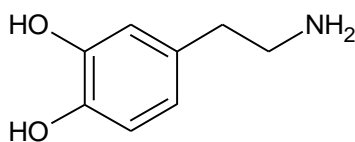
Alates cAMP avastamisest on huvi selle molekuli funktsiooni ja regulatsiooni kohta rakus järjest kasvanud. Põhjus seisneb selles, et cAMP mõjutab mitmeid olulisi bioloogilisi protsesse nagu näiteks metabolism, raku jagunemine ja migratsioon, insuliini tootmine, mälu ja immuunsussüsteem (Nikolaev *et al.* 2004).

cAMP mõjutab põhiliselt kolme efektorvalgu tüüpi: cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A (PKA), tsükliliste nukleotiidide poolt reguleeritud kationikanalid (cNGC) ja cAMP-sõltuv guaniini nukleotiidide vahetusfaktor Epac valk (ingl *Exchange protein activated by cAMP*) (Siegel *et al.* 2012).

cAMP kontsentratsiooni muutuste jälgimisel elusrakkudes on võimalik hinnata ligandide bioloogilist aktiivsust.

## Dopamiini retseptorid

Dopamiin (DA) on epinefriini ja norepinefriini kõrval kolmas põhiline katehoolamiinide perekonda kuuluv virgatsaine imetajate ajus (Missale *et al.* 1998). Selle struktuur koosneb kahealuselisest fenoolrühmast nimega katehool ning sellega seotud etüülamiinist või selle derivaadist (joonis 5). Dopamiini toodetakse närvirakkudes aminohappest türosiin ning sellest saab edasi toota virgatsaineid epinefriin ja norepinefriin (Beaulieu ja Gainetdinov 2011, Siegel *et al.* 2012). DA on primaarseks ligandiks dopamiini retseptoritele, mis on G-valguga seotud retseptorid.



**Joonis 5.** Dopamiini struktuur.

Esimest korda mainiti dopamiini retseptoreid 1972. aastal, kui J.W. Kebabian ja D.B. Calne avastasid, et dopamiiniga saab stimuleerida ensüümi AC (Missale *et al.* 1998). Kuigi dopaminergiliste närvirakkude osakaal ajus on väga väike ( $<1/100000$

ajus olevas närvirakust) on dopaminergiliste süsteemide uurimine kaasaegses meditsiinis väga oluline, sest need on ravimsihtmärgiks haigustele nagu Parkinsoni tõbi, tähelepanupuudus- ja hüperaktiivsushäire (ADHD), skisofreenia, bipolaarne häire, Huntingtoni tõbi ja Tourette'i sündroom (Rondou *et al.* 2010; Beaulieu ja Gainetdinov 2011).

DA retseptoreid leidub põhiliselt kesknärvisüsteemis, kus nad reguleerivad mitmeid neuroloogilisi protsesse, sealhulgas liikumist, tunnetust ja emotsioone. DA retseptoreid leidub mõningal määral ka väljaspool aju, põhiliselt neerudes ja perifeerses veresoonkonnas, kus nad reguleerivad näiteks naatriumi homeostaasi, kardiovaskulaarseid funktsioone ja hormoonide eraldumist. (Missale *et al.* 1998)

DA retseptoreid on kokku viis alatüüpi: D1, D2, D3, D4 ja D5. Retseptorite molekulmassid jäävad vahemikku 41-53 kDa, olenevalt retseptori alatüübist (Beaulieu ja Gainetdinov 2011). Need alatüübid on funktsiooni alusel jagatud kahte perekonda: D1- ja D2-tüüpi retseptorid. D1-tüüpi retseptorite alla kuuluvad D1 ja D5 retseptorite alatüübid. Need on seotud  $G_s\alpha$ -alaühikuga, mis stimuleerib ensüümi AC ning seega ka stimuleerib cAMP tootmist ATP-st. D2-tüüpi retseptorite alla kuuluvad D2, D3 ja D4 retseptorite alatüübid ning need on seotud  $G_i\alpha$ -alaühikuga, mis inhibeerib ensüümi AC ning seega alandab cAMP kontsentratsiooni rakus. (Siegel *et al.* 2012)

Lisaks funktsioonile erinevad dopamiini retseptorite alatüübid veel leviku, asukoha ja struktuuri poolest. D1R on levinuim dopamiini retseptor inimajus (Siegel *et al.* 2012). Asukoha poolest leidub D1-tüüpi retseptoreid ning D4R vaid postsünaptilisel membraanil (Rondou *et al.* 2010), kuid D2R ja D3R leidub nii postsünaptilisel kui ka presünaptilisel membraanil (Sokoloff *et al.* 2006; Rankin *et al.* 2010). See tähendab, et D2 ja D3 retseptorid saavad käituda ka kui autoreseptorid ning reguleerida virgatsaine vabanemist.

Struktuuriliselt erinevad D1-tüüpi retseptorid D2-tüüpi retseptoritest selle poolest, et neil on lühem kolmas rakusisene aas ning seitse korda pikem C-ots. Samuti puuduvad D1-tüüpi retseptoreid kodeerivatel geenidel intronid, kuid D2R geenil on kuus, D3R geenil viis ja D4R geenil kolm introni. Intronid on mittekodeerivad geeniosad, mis lõigatakse mRNA molekuli genereerimisel RNA molekulist välja. Seda protsessi nimetatakse splaissimiseks. Seega saabki vaid D2-tüüpi retseptoritel olla erinevate splaissimiste tõttu mitmeid splaissvariante. (Beaulieu ja Gainetdinov 2011, Siegel *et al.* 2012)

Erinevate vaheltlõikuste tõttu neljanda ja viienda introni vahel asuval eksonil D2R mRNAs on D2 retseptoreid kahte liiki: pikk D2 (D2<sub>L</sub>) ja lühike D2 (D2<sub>S</sub>) retseptor (Maggio ja Millan 2009). D2<sub>L</sub> retseptoril on kolmandas rakusiseses aasas 29 aminohappejääki rohkem kui D2<sub>S</sub> retseptoril (Usiello *et al.* 2000). Kui varem arvati, et mõlemal retseptoril on ühesugune funktsioon, siis 2000. aastal avaldatud artiklis leidsid Usiello *et al.*, et nende funktsioonid siiski erinevad. D2<sub>L</sub> retseptoril on põhiliselt postsünaptilise retseptori funktsioonid ning D2<sub>S</sub> retseptoril on põhiliselt presünaptilise autoreseptori funktsioonid.

Kuigi on sünteesitud üsna selektiivseid ligande D1- ja D2-tüüpi retseptoritele, siis küllaltki suure struktuurilise sarnasuse tõttu retseptorite alatüüpide vahel on keeruline sünteesida piisavalt selektiivseid ligande D1- või D2-tüüpi retseptorite perekonna erinevatele alatüüpidele. D1 ja D5 retseptoritel on 80% ulatuses ühesugune transmembraanne sidumisdomeen. D3 ja D4 retseptoritel on D2 retseptoriga vastavalt 75% ja 53% ühesugused sidumisdomeenid (Beaulieu ja Gainetdinov 2011). Kõige suurem selektiivsus on suudetud saavutada D4R antagonistide puhul, mille afiinsus D4 retseptorile erineb rohkem kui 1000 korda afiinsusest teistele alatüüpidele. D3R antagonistide afiinsus erineb sealjuures vaid kuni 100 korda afiinsusest D2 retseptorile (Beaulieu ja Gainetdinov 2011). D1-tüüpi retseptoritel on kõrge afiinsus bensoasepiinidele, mida kasutatakse rahustitena, unetuse raviks ja lihaste lõdvendamiseks. Samas on D1-tüüpi retseptoritel madal afiinsus bensamiidide suhtes nagu näiteks sulpiriid, mis on kliiniliselt kasutatav D2 ja D3 retseptorite selektiivne antagonist. D1 ja D5 retseptorid on farmakoloogiliste omaduste poolest sarnased, kuid D5 retseptoril on suurem afiinsus dopamiini suhtes kui D1 retseptoril. D2-tüüpi retseptorid on olulised märklauad antipsühhootikumidele ning Parkinsoni tõve ravimitele. Kui Parkinsoni tõbi on seotud dopaminergilise süsteemi tundlikkuse langusega, siis skisofreenia on seotud tundlikkuse kasvuga. Arvatakse, et skisofreenia on seotud just D2 ja D3 retseptorite suurenenud tundlikkusega. Kõik tänapäeva meditsiinis kasutusel olevad antipsühhootikumid, v.a aripiprasool, on D2-tüüpi retseptorite antagonistid, kuid aina enam arvatakse, et mitmetel funktsioonidel, mida reguleerib põhiliselt D2 retseptor, on tegelikult suur roll ka D3 retseptoritel. (Beaulieu ja Gainetdinov 2011, Siegel *et al.* 2012) Seetõttu on viimase aja üks suurimaid väljakutseid toota D3R selektiivseid ligande, kuid see on keeruline, sest enamik ligande, mis mõjuvad D3R-le, mõjuvad ka D2R-le (Carlsson *et al.* 2011).

Sama oluline kui on selektiivsete ligandide väljatöötamine dopamiini retseptoritele, on ka nende ligandide mõju uurimine ja kvantifitseerimine.  $G_s$ -süsteemi puhul on see küllaltki lihtne mõõtes cAMP taseme tõusu elusrakkudes. Retseptori agonist stimuleerib cAMP tootmist rakus ning ligandi efekt avaldubki cAMP taseme tõusus.  $G_i$ -seotud retseptorite puhul, mida on rakkudes rohkem kui  $G_s$ -seotud retseptoreid, on ligandi mõju uurimine palju keerulisem, sest agonist inhibeerib cAMP tootmist rakus. Seega tuleb cAMP taseme languse mõõtmiseks kõigepealt suurendada cAMP kontsentratsiooni rakus. Selleks lisatakse rakkudele forskolini (joonis 3), mis otse AC-le mõjudes cAMP taset rakus tõstab. Veel keerulisem on aga uurida  $G_i$ -süsteemi antagonistide mõju, sest sellisel juhul tuleb pärast forskolini ja agonisti lisamist agonist retseptoritelt antagonistiga välja tõrjuda, mistõttu cAMP taseme muutuse määrab kolme erineva aine kontsentratsioonide vahekord (Zhang ja Xie 2012).

### **cAMP taseme määramise meetodid**

Eelmistel kümnenditel on levinuimaks cAMP määramise meetodiks olnud radioaktiivsel märgistusel põhinev meetod, kus lisatakse rakkudele eelnevalt [ $^3H$ ]-adeniiniga märgistatud adeniini nukleotiidid. Pärast ligandi lisamist on Dowex/Alumina kolonnkromatograafia abil võimalik määrata tekkinud [ $^3H$ ]cAMP hulka rakkudes. Selle meetodi eelisteks on suur tundlikkus ja suur dünaamiline määramisala. (Hill *et al.* 2010)

Teine levinud *in vitro* meetod cAMP kontsentratsiooni määramiseks rakus põhineb radioimmuunanalüüsil (RIA). Rakus olev cAMP konkureerib radioaktiivselt märgistatud [ $^{125}I$ ]cAMP-ga cAMP-vastasele antikehale sidumisel. Radioaktiivse cAMP-ga seotud antikeha hulka saab mõõta kasutades stsintillandiga (ioniseeriva kiirgusega ergastamisel luminesceeruv materjal) kaetud plaate. Stsintillandid tekitavad valgussignaale olles piisavalt lähedal [ $^{125}I$ ]cAMP-ga seotud antikehadele. Radioaktiivse antikeha hulk on pöördvõrdeline rakus oleva cAMP kontsentratsiooniga. Meetod on tundlik ja määramisala on lai, samuti on eeliseks see, et stimulatsioon ja cAMP hulga määramine toimub ühes lahuses. Meetod on aga destruktiivne ning seega pole võimalik mõõta kontsentratsiooni muutumist ajas.

Samuti eelistatakse ohutumaid ja odavamaid mitteradioaktiivseid meetodeid. (Williams 2004, Nikolaev ja Lohse 2006)

Meie töörühmas on varem uuritud ligandide mõju D1, D2 ja D3 retseptoritele, kasutades radioaktiivse [ $^3\text{H}$ ]cAMP meetodit. Selle puhul konkureerivad rakus sünteesitud cAMP molekulid [ $^3\text{H}$ ]cAMP molekulidega kindlale cAMP-sidumisvalgule seostumisel *in vitro*. Raku lüsaadis leiduva cAMP ja [ $^3\text{H}$ ]cAMP suhtest on võimalik leida ligandi seostumisel tekkinud cAMP hulga muutus (Vonk *et al.* 2008). Selle meetodiga andsid usaldusväärseid tulemusi vaid katsed D1 ja D2 retseptoritega. Selle põhjusteks arvati olevat D3 retseptori nõrk sidumine G-valguga või ka meetodi liiga väike tundlikkus.

cAMP kontsentratsiooni on võimalik mõõta ka selle seostumise kaudu cAMP poolt mõjutatavatele efektorvalkudele. Üks lihtsamaid sellelaadseid meetodeid põhineb omadusel, et cAMP kontsentratsioon mõjutab PKA-le sidumise kaudu ühe kindla, uuritavasse rakku lisatud, reportergeeni ekspressioonitaset. Selleks, et cAMP reportergeeni ekspressiooni mõjutada saaks, peab geen sisaldama cAMP vastuselementi (CRE). Reportergeen reguleerib mingi kindla ensüümi või fluorestseeruva/biolumineeruva valgu ekspressiooni, mille signaali taset on võimalik mõõta. Reportervalk peab olema kergesti eristatav teistest ühenditest ning sellel peab olema lühike poolestusaeg, et valgu basaalne akumulatsioon oleks võimalikult väike ja seega meetodi tundlikkus võimalikult suur. Meetodi puuduseks on see, et cAMP-l on peale PKA veel ka teisi efektorvalke ning seega võib cAMP mõjutada hoopis teisi signaaliradasid, mis ei aktiveeri PKA-d. Seega ei pruugi reportervalgu hulk olla proportsionaalne cAMP tegeliku hulgaga rakus. (Hill *et al.* 2010)

Praegusel ajal kasutatakse cAMP määramiseks enim erinevaid Försteri resonantsenergia ülekandel (FRET) põhinevaid biosensoreid. Sensorid koosnevad doonor ja aktseptor fluorofooridest ning FRET on kiirgusvaba energiaülekanne nende fluorofooride vahel. Selleks, et FRET saaks toimuda, peab doonor fluorofoori kiirgusspekter olulisel määral kattuma aktseptor fluorofoori ergastusspektriga. FRET-i efektiivsus sõltub mitmetest faktoritest, sealhulgas fluorofooride omavahelisest kaugusest (FRET-i toimumiseks ei tohi see olla suurem kui 10 nm) (Klarenbeek *et al.* 2011) ja orientatsioonist. Fluorofooride vahele on olenevalt sensorist lisatud cAMP efektorvalk või selle cAMP siduv domeen, mis cAMP-ga seostudes muudab fluorofooride omavahelist kaugust ja orientatsiooni ning seega ka FRET-i efektiivsust. FRET signaali muutuse kaudu ongi võimalik määrata cAMP taseme muutust rakus.

FRET-il põhineva sensori põhiliseks eeliseks on selle mittedestruktiivsus ning elusrakkudes on võimalik jälgida cAMP kontsentratsiooni muutust ajas. (Nikolaev ja Lohse 2006)

### **FRET-il põhinevate cAMP biosensorite arendus**

Esimene FRET-il põhinev meetod cAMP kontsentratsiooni määramiseks põhines PKA dissotsieerumisel ning sensori nimeks sai FICRhR. Selleks märgistati PKA C ja R alaühikud vastavalt fluorestsüüni (Fl) ja rodamiiniga (Rh). Mitteaktiivses olekus moodustasid alaühikud kõrge FRET-ga tetrameerse kompleksi. Nelja cAMP molekuli seondumisel alaühikud dissotsieerusid ning seega ka Fl ja Rh kaugesid teineteisest alandades FRET-i. FICRhR-i puudusteks on märgistatud alaühikute keeruline tootmine ja ebastabiilsus. Sensor tuleb mikromolaarsetes kogustes rakkudesse süstida ning see võib tuua kaasa muutuse cAMP kineetikas ning muudes rakulistes protsessides. (Nikolaev ja Lohse 2006)

Nende puuduste kõrvaldamiseks modifitseerisid 2000. aastal Zaccolo *et al.* FICRhR-t ning võtsid Fl ja Rh asemel kasutusele rohelise fluorestseeruva valguga analoogid sinise ja rohelise ning hiljem veelgi mugavama kollase (YFP) ja helesinise (CFP) FRET paari. CFP kiirgusspekter on küllaltki lai ning sellel on märkimisväärne kattuvus YFP ergastusspektiga. Võimalikuks sai sensori geneetiline kodeeritus, seda sai ekspresseerida erinevates rakutüüpides ning mikrosüstimise vajadus jäi ära. Vaatamata paljude puuduste kõrvaldamisele, on PKA-l põhineval sensoril siiski mitmeid olulisi kitsaskohti. Sensori toimimiseks on tarvis, et kõik neli alaühikut oleksid rakus võrdsel määral ekspresseeritud, märgistatud alaühikud võivad seonduda märgistamata endogeensete alaühikutega ning C alaühiku üleekspressioon võib kahjustada rakku ja viia raku hävinemisele. Lisaks on PKA dissotsiatsioon mitmesammuline kooperative protsess, mis läbib enne C alaühikute eraldumist mitmeid konformatsioonimuutusi, mis aeglustavad sensori kineetikat võrreldes cAMP tegeliku kineetikaga. (Nikolaev ja Lohse 2006, Hill *et al.* 2010)

### **Epac valgul põhinevad biosensorid**

cAMP määramise meetodite edasiarendusena on valmistatud ka efektorvalguga Epac põhinevaid biosensoreid. Selleks paigaldati YFP ja CFP geenijärjestuste vahele



täispikk Epac valgu järjestus. Kui cAMP pole sensoriga seostunud, asuvad YFP ja CFP valgud teineteisele piisavalt lähedal, et ergastamisel 436 nm juures toimub FRET. Ühe cAMP molekuli seostumisel Epac valguga muutub sensori konformatsioon selliselt, et fluorofoorid kaugenevad teineteisest ja FRET väheneb. (Ponsioen *et al.* 2004)

Samaaegselt töötasid Epac valgul põhinevat sensorit välja ka Nikolaev *et al.*, kuid nende sensoris paigaldati YFP ja CFP vahele vaid Epac2 valgult pärinev tsüklilisi nukleotiide siduv domeen (CNBD). Sensor sai nimeks Epac2-camps (joonis 6) (Nikolaev *et al.* 2004). Seejärel loodi sensorid kasutades Epac1 cAMP siduvat domeeni (Epac1-camps) ja PKA RII alaühikut (PKA-camps). Nii Epac1-camps kui PKA-camps näitasid samuti FRET-i muutust cAMP kontsentratsiooni muutumisel, kuid cAMP afiinsus sensoritele oli ligikaudu 2,5 korra madalam kui Epac2-camps-le ( $EC_{50}$  väärtused:  $0.92 \pm 0.07 \mu\text{M}$  (Epac2-camps),  $2.35 \pm 0.42 \mu\text{M}$  (Epac1-camps),  $1.88 \pm 0.37 \mu\text{M}$  (PKA-camps)) (Nikolaev *et al.* 2004). Käesolevas töös kasutati bioloogilise aktiivsuse määramiseks Epac2-camps biosensorit (kingitus prof Martin Lohselt).

Nikolaev *et al.* ja Ponsioen *et al.* näitasid, et Epac valgul põhinevad sensorid on tundlikud just cAMP-le ja palju vähem tundlikud teistele tsüklilistele nukleotiididele. Samuti töötavad need sensorid palju kiiremini kui PKA-l põhinev sensor, sest FRET-i muutuse nägemiseks piisab ühe molekuli cAMP seostumisest võrreldes PKA sensoriga, kus sensori aktiveerimiseks on tarvis nelja cAMP molekuli. Epac2-camps vastust limiteerib cAMP tootmise kineetika, kuid PKA sensori vastust limiteerib põhiliselt PKA alaühikute keerukast dissotsiatsioonist tingitud sensori enda kineetika. Epac valgu cAMP sidumisdomeenil põhinevate sensorite eeliseks on see, et neil puudub katalüütiline aktiivus ja seega on nad rakkudes inertsed, samas kui PKA võib mõjutada mitmeid rakuprotsesse. Lisaks sellele on Epac valgul põhinev sensor monomolekulaarne ning seega on YFP ja CFP võrdselt ekspresseeritud. (Nikolaev *et al.* 2004, Ponsioen *et al.* 2004)

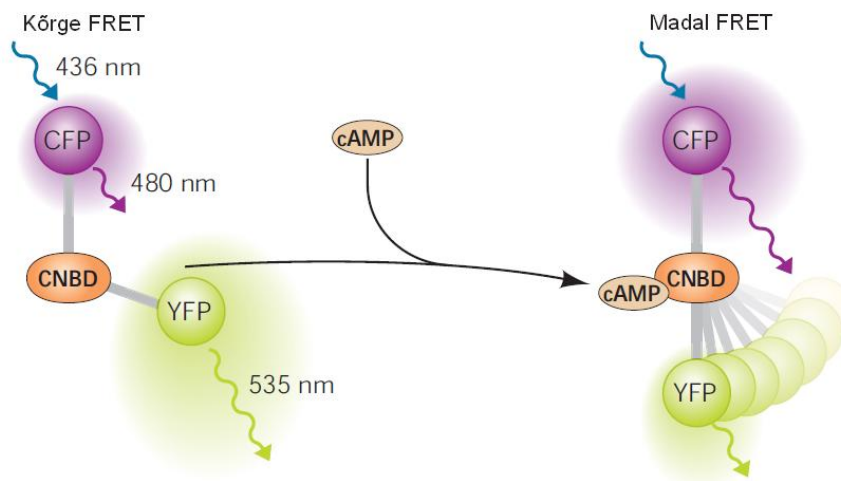
Van der Krogt *et al.* arendasid Epac valgul põhinevaid sensoreid edasi, uurides teiste fluorestseeruvate valkude mõju FRET-i muutusele. Nad leidsid, et YFP üheks puuduseks on UV kiirguse all ilmnev fotokromism (pöörduv nähtus, kus elektromagnetkiirguse toimel muundub ühend ühest vormist teiseks ning eri vormidel on erinevad neeldumisspektrid) (Dürr ja Bouas-Laurent 2003), seega pole fluorofoor

piisavalt fotostabiilne. Samuti sõltuvad YFP fluorestsentsomadused teatud määral pH-st ja  $\text{Cl}_2$  kontsentratsioonist. Teine suurem puudus oli CFP ja YFP kiirgusspektrite liigne kattuvus, mis võib viia CFP signaalilekke tõttu YFP detektsioonikanalisse signaali mitmekordsele nõrgenemisele. Seega püüdsid nad leida YFP/CFP paarile alternatiive, mis oleksid fotostabiilsed, ei sõltuks keskkonna pH-st ega ionsest jõust ning mille kiirgusspektrite kattuvus oleks minimaalne. (Krogt *et al.* 2008)

Nad leidsid, et YFP asendamine Venusega parandas mitmeid sensori parameetreid. Madalama  $\text{pK}_a$  väärtuse tõttu on Venuse sõltuvus pH-st palju väiksem kui YFP-l. Samuti oli Venus võrreldes YFP-ga palju fotostabiilsem, sest UV kiirguse all ei ilmnenud fotokromism. Venuse kasutamine sensoris tõstis FRET-i efektiivust ( $E = 0,31$ ) võrreldes CFP-Epac-YFP sensoriga ( $E = 0,25$ ) (Krogt *et al.* 2008).

Optimeerides fluorofooride orientatsiooni teineteise suhtes leidsid nad, et kõige parema FRET-i efektiivsuse andis Venuse orientatsiooniline mutant nimega  $\text{cp}^{173}\text{Venus}$  ( $\text{cp} = \text{circularly permuted}$ ). Järgmisena katsetasid nad tandemaktseptoreid, mis vaatamata puudusele mõõtmisel, peaksid suurendama FRET-i efektiivsust, tõstes aktseptori efektiivset neelduvust. Krogt *et al.* leidsid, et parim FRET-i efektiivsus saavutati  $\text{cp}^{173}\text{Venus}$ -Venus tandemit kasutades ( $E = 0,36$ ) (Krogt *et al.* 2008).

Klarenbeek *et al.* arendasid samas rühmas Epac valgul põhinevat sensorit edasi, asendades CFP uue doonor fluorofooriga mTurquoise. Sensori nimeks sai mTurquoise $\Delta$ -Epac(CD,  $\Delta\text{DEP}$ )- $\text{cp}^{173}\text{Venus}$ -Venus ehk lühendatult  $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$ . Nad leidsid, et uue sensoriga suurenes cAMP määramise dünaamiline ulatus, paranes signaal-müra suhe ning tõusis FRET-i efektiivsus ja seda nii fluorestsents-intensiivsust (FI) kui ka -eluiga mõõtes. Viimase puhul toob FRET-i muutus kaasa muutuse doonor fluorofoori elueas  $\tau$  ning selle kaudu on võimalik iseloomustada cAMP taseme muutust rakus. Võrreldes  $^C\text{Epac}^{\text{VV}}$  sensoriga (Krogt *et al.* 2008) tõusis  $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$  korral fluorestsentsi eluea mõõtmisel FRET-i efektiivsus 35% ja FI mõõtmisel 22%.  $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$  on ka eredam kui eelnevad sensorid, mis üheltpoolt tõstab FRET-i efektiivsust, kuid teisalt suurendab ka mTurquoise signaali lekkimist Venus detektsioonikanalisse (Klarenbeek *et al.* 2011), mis aga ei ole probleemiks mõõtmistel fluorestsentselueal põhinevate meetoditega.



**Joonis 6.** Epac valgul põhineva cAMP biosensori tööpõhimõte. Sensor koosneb kahest fluorofoorist CFP ja YFP, mille vahel paikneb cAMP siduv domeen (CNBD). Kui cAMP pole sensorile seondunud, on fluorofoorid teineteisele piisavalt lähedal, et tekiks FRET. cAMP seondumisel kaugenevad fluorofoorid teineteisest ja seeläbi FRET väheneb. Kohandatud. (Nikolaev ja Lohse 2006).

### cAMP biosensorite BacMam ekspressioonisüsteem

BacMam ekspressioonisüsteem pakub tõhusa ja lihtsa mooduse soovitud valguga ekspresseerimiseks vajalike geenide toimetamiseks imetajarakkudesse. Termin BacMam tuleneb sõnadest bakuloviirus (ingl **baculo**virus) ja imetajarakk (ingl **mamm**alian cell). Bakuloviirused on putukarakkude DNA viirused, mis on võimelised nakatama enam kui 500 putukaliiki (Hu 2008). Kui algul arvati, et bakuloviiruste abil saab valke ekspresseerida vaid putukarakkudes, siis 1990-ndatel aastatel avastati, et kui viiruse genoomi viia lisaks soovitud geenile ka imetajarakkudes efektiivselt töötav promootor, siis on rekombinantsete valkude tootmine võimalik ka imetajarakkudes (Fornwald *et al.* 2007, Hu 2008). Käesolevas töös kasutatakse BacMam ekspressioonisüsteemi FRET-il põhinevate biosensorite geenijärjestuste viimiseks imetajarakkudesse.

BacMam ekspressioonisüsteemil on mitmeid eeliseid võrreldes teistel vektoritel (nt retro-, lenti- või adenoviirused) põhinevate ekspressioonisüsteemidega. Bakuloviirused ei paljune imetajarakkudes, nad pole rakkudele mürgised ning lagunevad rakkudes aja jooksul, seega on nende rakendamine biotehnoloogias ohutu. Bakuloviiruse genoomi on võimalik sisestada kuni 38 kbp suurune geenijärjestus, seega on võimalik ekspresseerida suuri valke ning ka mitut valku samaaegselt. Bakuloviiruseid on küllalt lihtne konstrueerida ning soodne toota suurtes kogustes, sest piisab vaid rakkude viirusega nakatamisest ning nende paljundamisest. Kuna

bakuloviirused on putukaviirused, siis puuduvad imetajatel bakuloviiruste vastu antikehad ja T-rakud, mistõttu pole ohtu, et viirus pärast sisestamist hävitatakse, nagu võib juhtuda näiteks adenoviiruse korral. Samuti on BacMam süsteem üsna universaalne, võimaldades nakatada mitmeid erinevaid rakukultuure. Viiruse doosi varieerimise abil on võimalik reguleerida valgu ekspressiooni taset rakus. Bakuloviiruse ekspressioon rakus pole püsiv, vaid möödub bakuloviiruse DNA lagunemise tõttu enamiku rakkude korral 7-14 päeva jooksul. Samas on võimalik toota ka püsivalt viirust ekspresseerivat rakuliini. Näiteks leiti, et nakatades hiina hamstri munasarja CHO (ingl *chinese hamster ovary*) rakke neomütsiini fosfotransferaasi ekspresseeriva bakuloviirusega ning selekteerides vastavat geeni ekspresseerivad rakud G418 antibiootikumiga, sisenevad suvalise pikkusega bakuloviiruse fragmendid raku kromosoomi. Seega tekivad CHO rakud, mis on võimelised valku ekspresseerima kuni viis kuud. (Fornwald *et al.* 2007, Kost *et al.* 2007, Hu 2008)

Vaatamata paljudele eelistele on BacMam ekspressioonisüsteemil ka puuduseid. Näiteks on piisava valgu ekspressiooni jaoks tarvis kasutada kõrge tiitriga viirust, sest lahja viiruse lisamisel oleks lisatav ruumala liiga suur. Seega on tarvis viiruseid kontsentreerida ja seda on võimalik teha näiteks tsentrifuugimisega. Samuti on viirus tundlik valgusele ning seda saab puhverdatud soolalahuses +4°C juures säilitada vaid mõned kuud. Samas säilib viiruse lahus vedelas lämmastikus või -80°C juures kauem, kuid viiruse varu sulatamine toob kaasa mõningad kaod viiruse degradeerumise tõttu.

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### Materjalid ja aparatuur

Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde (DMEM), penitsilliin, streptomütsiin, genetitsiin (G418), *Roswell Park Memorial Institute* rakusööde (RPMI) ning Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus (DPBS) osteti firmalt PAA Laboratories GmbH. Veiseloote seerum (FBS) osteti firmalt Gibco. Naatriumbutanaat (NaBu), trüpaansinise lahus ja dopamiin osteti firmalt Sigma-Aldrich Co. Forskolin osteti firmalt Tocris.

Inimese embrüo neerurakkudel (HEK293) (American Type Culture Collection) põhinevad püsiliinid, mis toodavad vastavalt rekombinantseid D2<sub>L</sub> või D3 retseptoreid, loodi meie laboris Reet Reinart-Okugbeni poolt (Reinart-Okugbeni *et al.* 2012). Rakke kasvatati polülüsiiniga kaetud Petri tassidel või 6-kohalistel plaatidel (Nunc) niiskus-reguleeritud inkubaatoris, 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

Rakukultuuride rutiinseks vaatluseks kasutati Olympus CKX31 mikroskoopi ning rakkude elumuse hindamiseks kasutati rakulugejat TC10<sup>TM</sup> Automated Cell Counter-it (Bio-Rad Laboratories), kus surnud rakkude värvimiseks kasutati 0,4%-list trüpaansinise lahust.

Epac2-camps sensorvalku kodeeriv plasmiid, pcDNA3.1(+)-EYFP-epac2B(*murine*)-ECFP saadi kingituseks prof Martin Lohselt Würzburgi Ülikooli Farmakoloogia ja Toksikoloogia Instituudist, Saksamaalt. Epac2-camps biosensori BacMam ekspressioonisüsteem loodi meie laboris Olga Mazina poolt (Mazina *et al.* 2012).

Funktsionaalsed katsed teostati PheraStar (BMG Labtech) plaatfluorimeetris 37°C juures. Ergastusfiltri läbilaskvus oli 427(20) nm ja kiirgusfiltrite läbilaskvus 530(20) nm (kanal A) ja 480(20) nm (kanal B). Mõlema kanali detektorite võimendus (GAIN) oli 1000. Fokaalkõrguseks oli 4,2 mm. Fluorestsentsintensiivsuse mõõtmine toimus iga 5 minuti tagant 20 minuti jooksul. Iga mõõtmise korral toimus ergastamine ja detekteerimine 20 järjestikuse valgusimpulsina. FRET muutused arvutati vastavalt valemile (Mazina *et al.* 2012):

$$\Delta \frac{YFP}{CFP} = \frac{\frac{YFP_0}{CFP_0} - \frac{YFP}{CFP}}{\frac{YFP_0}{CFP_0}}$$

kus YFP<sub>0</sub> ja CFP<sub>0</sub> tähistavad fluorestsentskiirgust vastavalt 480 nm ja 530 nm juures enne ligandi lisamist ning YFP ja CFP pärast ligandi lisamist. Muutus cAMP tasemes pärast ligandi lisamist esitati FRET-i protsentuaalse muutusena.

## HEK293 rakuliini kasvatamine

Rakusöötmena kasutati Dulbecco modifitseeritud Eagle'i söödet (DMEM), millele oli lisatud 10% veiseloote seerumit (FBS), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Söötmele lisati ka 400 µg/ml genetitsiini (G418), mis on antibiootikum DAR geeni sisaldavate rakkude selekteerimiseks.

## Sensorvalgu ekspresseerimine HEK293 rakuliinis

Katseks vajaminevaid rakke inkubeeriti 2-3 päeva enne BacMam viirustega nakatamist G418 vabas söötmes Petri tassidel. Katsele eelneval päeval eemaldati rakuplaatidelt rakusööde ning igale plaadile lisati 4 ml seerumivaba RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute* rakusööde) lahust ja 250 µl 10x BacMam viirust Epac2-camps sensori geeniga nakatuskordsusega (MOI) 200 (*ca* 10<sup>9</sup> viiruseosakest plaadil). Rakke inkubeeriti kaks kuni kolm tundi ning seejärel lisati igale plaadile 8 ml tavapärast rakusöödet (DMEM + 10% FBS + 100 IU/ml penitsilliin + 100 µg/ml streptomütsiin), millele oli lisatud naatriumbutanaati (NaBu). NaBu lõppkontsentratsioon plaadil oli 5 mM ning seda kasutati sensorvalgu ekspressiooni võimendamiseks. Rakke inkubeeriti vähemalt 24 tundi 37°C juures, sensorvalgu piisava ekspressiooni saavutamiseks.

## Funktsionaalsed katsed

Biosensorit ekspresseerivad rakud pesti plaatidelt söötmelahusega lahti ning tsentrifuugiti 5 min 800 rpm juures (Centrifuge CM-50). Pärast tsentrifuugimist

suspendeeriti rakud Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahuses (DPBS), milles oli  $\text{Ca}^{2+}$  (1,2 mM) ja  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 mM) ioone. Rakud kanti mustale, lamedapõhjalisele, 96-kohalisele plaadile (Corning, toote nr. 3993), igasse süvendisse 90  $\mu\text{l}$  rakususpensiooni. Ühe Petri tassi rakud jagati ühele 96-kohalisele plaadile, seega ühes süvendis 30 000 kuni 60 000 rakku. Rakkudel lasti katseplaadile kinnituda vähemalt tund aega. Uuritavatest ligandidest tehti 10-kordsed seerialahjendused alustades 10  $\mu\text{M}$ -st lahusest.

Ligandide seerialahjendused valmistati milli-Q vette, kuhu oli lisatud forskolini. Forskolini lõppkontsentratsioon katseplaadi süvendis oli 10  $\mu\text{M}$ . Katse esimeses etapis mõõdeti katseplaadi baastaseme FI. Seejärel lisati süvenditesse 10  $\mu\text{l}$  ligandilahust (lõppruumala süvendis 100  $\mu\text{l}$ ) ja jätkati fluorestsentsintensiivsuse mõõtmist.

## **Andmete töötlemine**

Andmete töötlemisel kasutati programmi MatLab version 7.12.0.635 (R2011a) (MathWorks, Inc.) ja tulemuste analüüsil ja graafilisel esitamisel programmi GraphPad Prism<sup>TM</sup> 5.00.

## TULEMUSED JA ARUTELU

### **G<sub>i</sub>-seotud retseptorite vahendatud cAMP taseme muutuste määramine elusrakkudes**

#### **Katsetingimuste optimeerimine**

Varasemalt ei ole meie laboris FRET biosensoriga G<sub>i</sub>-seotud retseptori aktivatsiooni määratud ning uue meetodika kasutuselevõtt vajab katseparameetrite optimeerimist. Esimeses etapis varieeriti nakatuskordsust, mis on Epac2-camps sensori ekspresseerimisel väga oluline. Liiga kõrge MOI juures on süsteem sensoriga küllastunud, mis tähendab, et sensori kontsentratsioon on palju suurem kui cAMP kontsentratsioon rakus. Kuna tegemist on fluorofooride intensiivsuste suhtel põhineva meetodiga, siis sensori üleekspresseerimisel jäävad väiksemad muutused cAMP kontsentratsioonis detekteerimata, sest selle tulemusel tekkinud intensiivsuste suhte muutus on väga väike. Liiga väikese MOI juures on aga sensor juba enne forskolini lisamist basaalse cAMP-ga küllastunud ning raku stimulatsioonil tekkinud cAMP hulka on keeruline detekteerida.

MOI optimeerimiskatsed teostati D2R ekspresseerival HEK293 rakuliinil MOI vahemikus 200-600. Vähema viiruse kogusega piisavat sensori ekspressiooni ei saavutatud. Ligandidena kasutati dopamiini ning apomorfiini (APO). Saadud kontsentratsioon-vastus kõveratelt tulenes, et nakatuskordsuse tõstmine ligikaudu 4-5%-list signaaliakent ei suurendanud. Seega otsustati viiruse kulu vähendamiseks jääda edaspidi MOI 200 juurde.

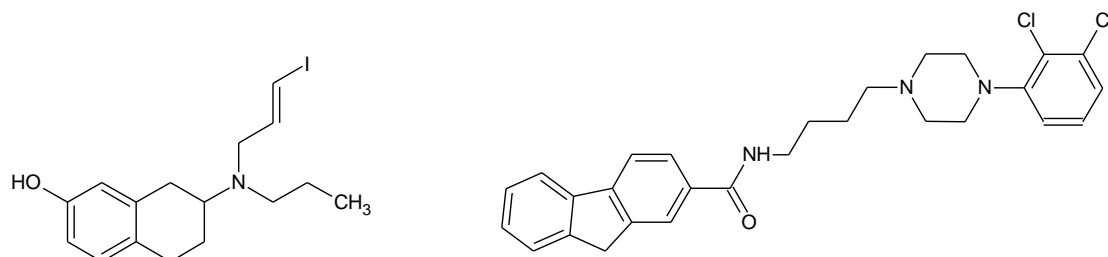
Järgmise etapina optimeeriti rakkudele lisatava forskolini kontsentratsiooni. Liiga kõrge forskolini kontsentratsiooni korral tekib suures koguses cAMP-d ja väikesed muutused cAMP kontsentratsioonis jäävad detekteerimata. Liiga madala forskolini kontsentratsiooni korral ei teki piisavalt palju cAMP-d, ning seetõttu kannatab sensori tundlikkus.

Optimeerimiskatsed teostati samuti D2R ekspresseerival rakuliinil ning retseptori agonistina kasutati dopamiini. FI-d mõõdeti nelja erineva forskolini kontsentratsiooni juures: 10, 32, 50 ja 100 µM. Parimad signaal-müra suhted saadi 10 ja 32 µM forskolini kasutamisel ning lisaine koguse minimaliseerimiseks otsustati jääda 10 µM kontsentratsiooni juurde.



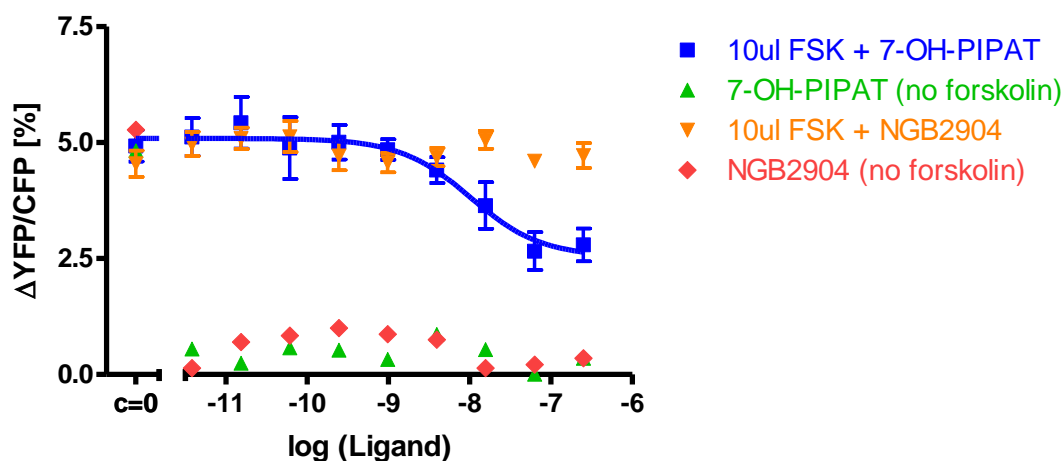
## Epac2-camps sensori valideerimine

Pärast katsetingimuste optimeerimist sooviti näha, kas antud sensoriga saadud tulemused ühtivad kirjanduses toodud andmetega. Samuti vaadati, kas sensor suudab eristada agonisti ja antagonistiga ning kas tulemused erinevad D2 ja D3 retseptorite korral. Selleks kasutati ligandidena selektiivset D3R agonisti 7-OH-PIPAT ning antagonistiga NGB2904 (joonis 7).



**Joonis 7.** Selektiivse D3R agonisti 7-OH-PIPAT (vasakul) ja antagonistiga NGB2904 (paremal) struktuurid.

Saadud graafikult (joonis 8) võib näha, et 7-OH-PIPAT alandas cAMP taset süsteemis ning NGB2904 ei omanud efekti cAMP tasemele. 7-OH-PIPAT pEC<sub>50</sub> väärtused olid heas kooskõlas kirjanduses toodud andmetega (Chumpradit *et al.* 1994), kuid selektiivsus D3R-le oli minimaalne (pEC<sub>50</sub> väärtused D2R ja D3R-le olid vastavalt 7,94 ja 7,99).



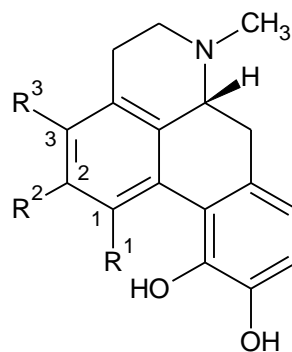
**Joonis 8.** D3 retseptorile selektiivse agonisti (7-OH-PIPAT) ja antagonistiga (NGB2904) mõju cAMP tasemele D3 retseptorit ekspresseerivas HE293 rakuliinis. Katsed on teostatud tripikaatides 15 minutit pärast ligandi lisamist.

Uurimaks, kas Epac2-camp sensoriga on võimalik määrata ka antagonistide  $IC_{50}$  väärtusi, teostati katse, kus NGB2904 konkureeris agonistiga (DA ja APO) retseptori sidumiskohale. Kahjuks oli sensori detektsiooniaken kolmekomponendilise katse jaoks (antagonist, agonist ja forskolin) liiga väike ja müra tase osutus usaldusväärsete  $IC_{50}$  väärtuste määramiseks liiga suureks. Kolmest korduskatses järeldus, et käesoleva sensoriga ei ole võimalik määrata D2R või D3R antagonistide mõju cAMP hulga, selleks oleks vaja kasutada laiemat dünaamilist määramisvahemikuga cAMP biosensoreid. Esimesed positiivsed tulemused antagonistide  $IC_{50}$  väärtuste määramisel on saavutatud  $TEpac^{VV}$  sensoriga (Klarenbeek *et al.* 2011) (meie töörühma avaldamata andmed).

### **1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilise aktiivsuse määramine**

Apomorfiin (Joonis 9) on dopamiini retseptorite agonist, mida kasutatakse muuhulgas Parkinsoni tõve raviks (Zhang *et al.* 2007). Erinevate asenduste kaudu ühendi struktuuris üritatakse apomorfiini farmakoloogilisi omadusi parandada. Ungaris, Debreceni Ülikoolis, professor Attila Sipose töörühmas sünteesiti koostööprojekti raames kuus 1-asendatud apomorfiini derivaati. Käesolevas töös määrati 1-asendatud apomorfiini derivaatide (Tabel 1) bioloogiline aktiivsus Epac2-camps FRET biosensoriga.

Meie töörühmas on varem radioaktiivse [ $^3H$ ]cAMP meetodil uuritud samade ühendite mõju D1, D2 ja D3 retseptoritele, kuid usaldusväärseid tulemusi andsid vaid D1 ja D2 retseptorid. Funktsionaalsed katsed Epac2-camps biosensoriga (Tabel 3) andsid reprodutseeritavaid tulemusi aga kõigi kolme dopamiini retseptori alatüübi jaoks. Nii cAMP biosensori kui ka [ $^3H$ ]cAMP meetodil mõõdetud süsteemis käitusid kõik ühendid apomorfiiniga võrreldes täisagonistidena. Kõigi 1-asendatud apomorfiini derivaatide afiinsus dopamiini retseptoritele oli vähemalt alla mikromolaarse (Tabel 2).



**Joonis 9.** Apomorfiini struktuur asendusrühmadega R1, R2 ja R3. Apomorfiini korral on asendusrühmadeks vesinikuaatomid.

1-asendatud apomorfiini derivaadid	
Ühend	R1, R2 = H; R3 =
1	—CH <sub>3</sub>
2	
3	
4	
5	
6	

**Tabel 1.** 1-asendatud apomorfiini derivaatide asendusrühmade struktuurid.

Meie töörühmas on Reet Reinart-Okugbeni poolt samuti tehtud sidumiskatseid radioaktiivse ligandiga D1, D2 ja D3 retseptoritele. Selleks lisati rakumembraanide homogenaadile sama kontsentratsiooniga radioligandi: D1R korral D1-spetsiifilist ligandi [<sup>3</sup>H]SCH23390 ja D2R ja D3R korral D2-spetsiifilist ligandi [<sup>3</sup>H]rakolpiriid. Katsed teostati 96-kohalistel katseplaatidel. Uuritavatest ligandidest tehti seerialahjendused (0,1 – 100 µM) ning lisati need rakuplaadile membraani ning

radioligandi lahusele. Reaktsioonid peatati filtreerimisega läbi GF/B klaasfiiber filtrite ning filtrite radioaktiivsuse hulk määrati stsintillatsiooniloenduriga. (Reinart-Okugbeni *et al.* 2013)

Sidumiskatsed radioaktiivse ligandiga				
		K <sub>i</sub> (nM) ± SEM		Selektiivsus
Ühend	R-rühm	D2	D3	D2/D3
1	Me	54 ± 10	23 ± 5	2,4
2	Bn	77 ± 20	55 ± 9	1,4
3	OH-Me	43 ± 13	17 ± 4	2,6
4	4-OH-bensüül	47 ± 9	28 ± 6	1,7
5	4-N,N-dimetüülaminobensüül	79 ± 31	53 ± 12	1,5
6	(4-OH-1-naftüül)-metüül	170 ± 64	130 ± 30	1,3
APO	H	53 ± 15	17 ± 3	3,2

**Tabel 2.** 1-asendatud apomorfiini derivaatide sidumiskatsete tulemused. K<sub>i</sub> on inhibeerimiskonstant, mis iseloomustab ühendi võimet inhibeerida [<sup>3</sup>H]SCH23390 (D1 korral) või [<sup>3</sup>H]rakolpiriidi (D2 ja D3 korral) sidumist retseptori alatüübile HEK293 membraanil. Selektiivsus näitab D2 ja D3 retseptorite K<sub>i</sub> väärtuste suhet. Tulemused on esitatud viisil keskmine ± SEM vähemalt kolmest duplikaadis või triplikaadis tehtud korduskatsetest. (Reinart-Okugbeni *et al.* 2013)

Bioloogilise aktiivsuse määramine Epac-2-camps biosensoriga				
		pEC <sub>50</sub> ± SEM		Selektiivsus
Ühend	R-rühm	D2	D3	D2/D3
1	Me	7,96 ± 0,29	8,16 ± 0,21	1,6
2	Bn	8,31 ± 0,33	7,87 ± 0,25	0,4
3	OH-Me	8,43 ± 0,37	8,59 ± 0,31	1,4
4	4-OH-bensüül	8,33 ± 0,25	8,19 ± 0,22	0,7
5	4-N,N-dimetüülaminobensüül	7,10 ± 0,08	7,67 ± 0,40	3,7
6	(4-OH-1-naftüül)-metüül	7,49 ± 0,07	7,68 ± 0,24	1,5
APO	H	8,70 ± 0,12	8,56 ± 0,09	1,5
DA		8,53 ± 0,13	8,71 ± 0,04	0,7

**Tabel 3.** 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogiline aktiivsus dopamiini D2 ja D3 retseptoritele mõõdetud Epac2-camp sensoriga. pEC<sub>50</sub>: negatiivne logaritm ligandi poolefektivsest kontsentratsioonist. Selektiivsus näitab D2 ja D3 retseptorite pEC<sub>50</sub> väärtuste suhet. Esitatud vähemalt kolme korduskatse keskmine ± SEM, katsed teostatud triplikaatides.

Sidumiskatsetest radioaktiivse ligandiga (tabel 2) tuleneb, et nii apomorfiin kui ka kõik selle derivaadid on selektiivsed D3 retseptorile. Funktsionaalkatsetest cAMP biosensoriga (tabel 3, joonis 10 ja 11) ilmneb aga, et ühendid 2 ja 4 on

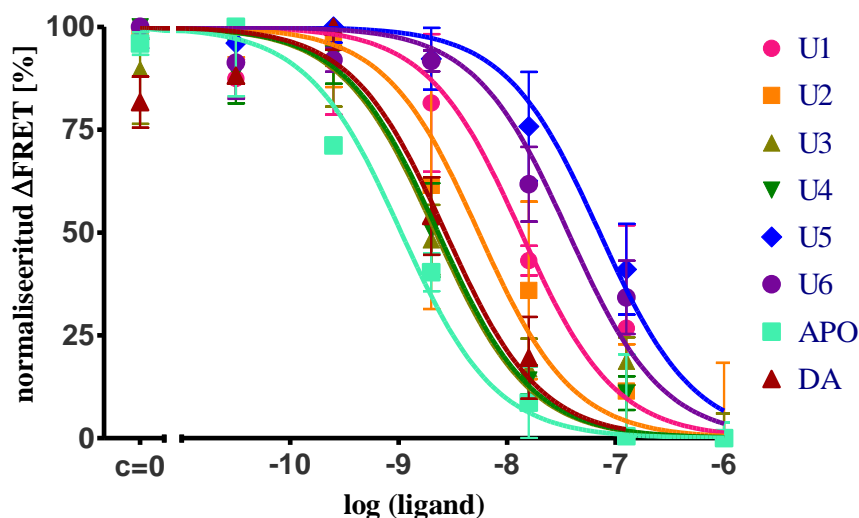
selektiivsed D2R-le. Funktsionaalkatsete tulemustest võib seega järeldada, et asendades apomorfiini struktuuris R1 rühma nukleofiilse fenüül- või fenoolrühmaga muutub ühend selektiivseks D2R-le. See võib viidata D2R sidumistasku positiivsemale laengule võrreldes D3R-ga.

Sidumiskatsete põhjal on kõige suuremad selektiivsused D3 retseptorile ühenditel 1 ja 3 (vastavalt 2,4 ja 2,6 korda), kuid need jäid alla apomorfiini selektiivsusele (3,2 korda). Tulemustest võib järeldada, et alifaatsed asendusrühmad alandavad ühendi selektiivsust D3R-le kõige vähem võrreldes teiste asendusrühmadega. Ühendid 1 ja 3 on cAMP aktivatsioonil aga oma selektiivsuse D3R-le kaotanud. Samuti on apomorfiini selektiivsus D3R-le rohkem kui poole väiksem võrreldes sidumiskatsetest saadud andmetega.

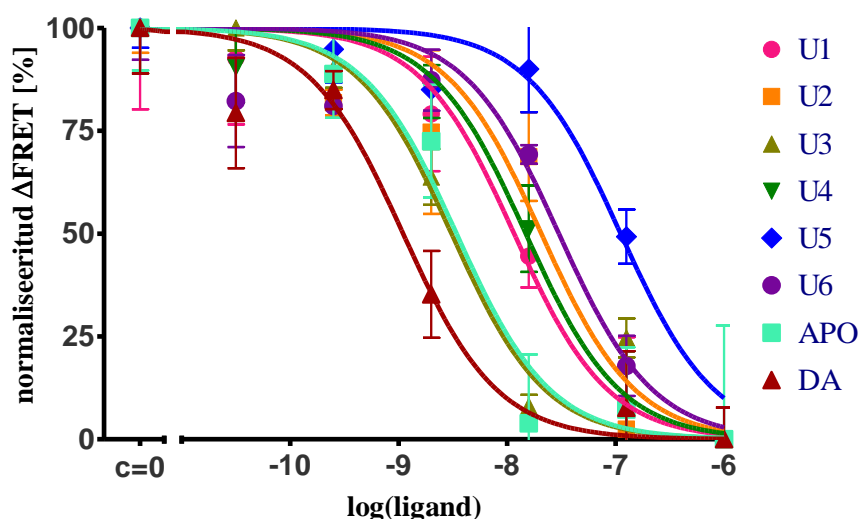
cAMP biosensoriga saadud tulemustest eristub ühend 5, mis on 3,7 korda selektiivsem D3R-le, ületades seega pea 2,5 kordselt apomorfiini selektiivsust ja olles seega suurimat selektiivsust omav aine. Seega suurendab 4-N,N-dimetüülamino-bensüülrühm ühendi selektiivsust D3R-le, mis võib olla seotud asendusrühma positiivse laenguga. See võib viidata D3R sidumiskoha negatiivsemale laengule võrreldes D2R-ga. Ühendi mõjusust mõlemale retseptorile on aga kõigist teistest madalam. Sidumiskatsetes ei oma ühend 5 aga märkimisväärset selektiivsust D3R-le ning ühendi afiinsus mõlemale retseptorile on üks madalamaid.

Afiinsuse suur vähenemine toimus ühendi 6 korral, kus afiinsus D2R-le on üle kolme korra väiksem ning D3R-le peaaegu kaheksa korda väiksem võrreldes apomorfiiniga. Sama ühend omab sidumiskatsetes ka kõige väiksemat D3R selektiivsust. Samuti on ühendi 6 mõjusust D2 ja D3 retseptoritele üks madalamaid. Seega naftüülrühma lisamine vähendab nii ühendi afiinsust kui ka mõjusust D2R ja D3R-le. Põhjuseks võib olla naftaleenrühma suurus ning steeriliste takistuste tõttu võib olla raskendatud ühendi seondumine retseptorile.

Peaaegu kõigi 1-asendatud apomorfiini derivaatide mõjusust oli apomorfiini omast madalam. Ka ühendite afiinsused olid üldiselt apomorfiini omast madalamad kui välja arvata ühendid 3 ja 4, mille afiinsus D2R-le oli apomorfiini omast veidi suurem.



**Joonis 10.** 1-asendatud apomorfiini derivaatide mõjus D2 retseptorit ekspresseerivate rakkude cAMP tasemele. Katsed on teostatud kolmes korduses, tripikaatides ja graafik on normaliseeritud arvestades 100%-ks maksimaalset FRET muutust antud katsepäeval.



**Joonis 11.** 1-asendatud apomorfiini derivaatide mõjus D3 retseptorit ekspresseerivate rakkude cAMP tasemele. Katsed on teostatud kolmes korduses, tripikaatides ja graafik on normaliseeritud arvestades 100%-ks maksimaalset FRET muutust antud katsepäeval.

Apomorfiin, mis on mõjus dopamiini retseptorite täisagonist, on üks tänapäeval kasutatavaid Parkinsoni tõve ravimeid. Ühendi modifitseerimisega üritatakse leida uusi suurema D3R selektiivsusega aineid, mis oleksid veelgi paremate farmakoloogiliste omadustega. Sidumisafiinsus on üks parameetritest, mille järgi on võimalik ühendi farmakoloogilisi omadusi uurida. See annab meile informatsiooni aine sidumise tugevusest retseptorile ning selle järgi on ka võimalik ennustada sidumismehhanismi. Meie töörühmas on mõõdetud 1-asendatud apomorfiini

derivaatide sidumisafiinsused radioaktiivse ligandi seostumise meetodil ning saadud andmete põhjal ei leitud ühtki apomorfiinist D3-selektiivsemat ainet. Sidumisafiinsuse kõrval on teiseks oluliseks parameetriks veel ainete mõjususe ehk efekti suurus, mida aine retseptorile seondudes tekitab. 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilist aktiivsust on meie töörühmas eelnevalt uuritud [<sup>3</sup>H]camp konkureerimise meetodil, kuid D3R puhul ei õnnestunud antud meetodiga usaldusväärseid tulemusi saada. Põhjuseks arvati olevat D3 retseptori ja sellele vastava G-valgu nõrk seondumine või ka sobiva AC vormi puudus, mistõttu ligandi seondumine retseptorile ei tekitanud rakus piisavalt suurt cAMP taseme muutust, et seda määrata raku lüsaadis totaalse cAMP määramise meetodiga ning takistuseks võiski saada antud meetodi liiga väike tundlikkus.

Käesolevas töös on samade ainete bioloogilist aktiivsust uuritud Epac valgul põhineva sensoriga, mis võimaldab erinevalt eelnevatest meetoditest viia katseid läbi reaalajas ning elus rakkudel. Sisse seatud metoodika abil saadi usaldusväärseid tulemusi ka D3R korral ning erinevalt varasemast, võimaldab käesolev metoodika esimest korda teostada väikesemahulisi sõeluuringuid G<sub>i</sub>-seotud retseptorite ligandidele. See on oluline samm edasiseks ligandide arenduseks, sest võimaldab teostada sõeluuringuid erinevate D2 ja D3 retseptorite ligandidele ning leida uusi potentsiaalseid ravimikandidaate näiteks Parkinsoni tõvele ja skisofreeniale, mis on seotud just G<sub>i</sub>-seotud retseptorite väärtalitlusega. Võrreldes eelnevate radioaktiivsusel põhinevate meetoditega on käesolev fluorestsentsintensiivsusel põhinev meetod ohutum, suurema tundlikkusega ning suurimaks eeliseks on funktsionaalkatsete teostamise võimalikkus elus rakkudes.

Tulemused radioaktiivse cAMP (Reinart-Okugbeni *et al.* 2013) ning Epac valgul põhineva sensori meetodiga D2R-le ei lange 1-asendatud apomorfiini derivaatide iseloomustamisel täiel määral kokku ning seda ilmselt meetodite tundlikkuse erinevuse tõttu. Samuti ei võimalda [<sup>3</sup>H]camp meetod teostada katseid reaalajas ega elus rakkudel, mistõttu võivad tulemused erineda cAMP sensoriga mõõdetud tulemustest. cAMP sensoriga leiti, et suurimat potentsiaali edasi uurimiseks omab ühend 5, sest asendades 1. positsioonis vesiniku 4-N,N-dimetüülamino-bensüülrühmaga suureneb selektiivsus D3 retseptorile ligi 2,5 korda. Üllatavalt on aga sidumisandmete põhjal ühendi 5 selektiivsus D3R-le peaaegu 3 korda väiksem apomorfiini selektiivsusest. Sidumisandmete põhjal olid kõige D3 selektiivsemateks aineteks ühendid 1 ja 3 (vastavalt 2,4 ja 2,6 korda), mis aga cAMP biosensoriga

mõõtes olid peaaegu poole oma selektiivsusest kaotanud (vastavalt 1,6 ja 1,4 korda). Ligandide sidumisafiinsuste ja mõjususte omavaheliste tendentside mõningane lahknemine vajab veel lähemalt uurimist.

Kuigi sünteesitud ühendid mõjutasid selektiivsust D1 retseptorile võrreldes D2 ja D3 retseptoritega, siis märkimisväärset selektiivsust D2 ja D3 retseptoritele ei leitud. Kuna D2R ja D3R kuuluvad mõlemad D2-tüüpi retseptorite alla ning nende sidumisdomeenid on 75% ulatuses ühesugused (Beaulieu ja Gainetdinov 2011), siis ongi suure struktuurilise sarnasuse tõttu keeruline selektiivseid aineid sünteesida.

Kuna D3 retseptori kristallstruktuur on teada (Chien *et al.* 2010), siis edaspidi võiks uute potentsiaalsete ligandide välja sõelumiseks lisaks sidumis- ja funktsionaalkatsetele kasutada ka molekulaarset modelleerimist ja pökkumist (ingl *docking*). See võimaldaks juba enne aine sünteesimist ennustada selle aine seostumist ja mõju dopamiini retseptoritele ning seega vähendada ajakulu, mis muidu kaasneks aine sünteesimisele ja katsete teostamisele. Seega saaks sõeluuringuid läbi viia vaid ainetel, mille potentsiaal dopamiini retseptorite ligandina on juba eelnevalt arvutuslike meetoditega tõestatud.

Samuti võiks sidumisafiinsuse määramiseks võtta kasutusele fluorestsentsil põhinev meetod. Radioaktiivsed ligandid on ohtlikud, kallid ning neid on keeruline käidelda. Fluorestsentsil põhineva meetodi eelisteks oleks meetodi suurem ohutus, odavus ning saavutatav on ka kõrgem tundlikkus. Samuti võimaldaks see teostada katseid reaajas ning kaoks vajadus erinevateks pesemisprotsessideks, mistõttu oleks võimalik ka ligandide kiiremad sõeluuringud. Fluorestsentsmeetodi kasutuselevõtu puudusteks võib olla sobivate fluorofooride puudus, mis ligandile seostudes ei muudaks selle konformatsiooni ja sidumisomadusi. Selliste fluorestseeruvate ligandide arendus on väga keeruline ning ligandid ise üsna kallid.

Käesoleva töö eesmärgiks oli sisse seada Epac2-camps biosensoril põhinev meetod  $G_i$ -seotud retseptorite aktivatsiooni määramiseks ning selle abil 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilise aktiivsuse uurimiseks dopamiini D2 ja D3 retseptorites. Antud metoodika võimaldas määrata  $G_i$ -seotud retseptorite ligandide bioloogilist aktiivsust elus rakkudes, mida varem polnud meie laboris võimalik määrata. Mõõteti 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilist aktiivsust, kuid märkimisväärset selektiivsust D3 retseptorile ühegi aine korral ei leitud. Sellegipoolest väärivad mõningad ained edasist arendust kombineerituna molekulaarse modelleerimise ja pökkumisega. Nendeks on ained 1, 3 ja 5, kus



asendusrühmadeks on vastavalt metüül-, hüdroksümetüül- ja 4-N,N-dimetüülamino-bensüülrühm, mis näitasid suurimat selektiivsust D3 retseptorile (vastavalt 2,4, 2,6 ja 3,7 korda).

## KOKKUVÕTE

Dopamiini retseptorid on füsioloogiliselt olulised G-valguga seotud retseptorite perekonda kuuluvad retseptorid, mis on seotud rakkudevahelise signaaliülekandega. Nende väärtalitlus võib põhjustada mitmeid raskeid haiguseid, nagu näiteks skisofreenia ja Parkinsoni tõbi. Käesoleva töö eesmärgiks oli kohandada Epac valgul põhinev biosensor “Epac2-camps”  $G_i$ -seotud dopamiini D2 ja D3 retseptorite alatüüpidele ning uurida Debreceni Ülikoolis sünteesitud 1-asendatud apomorfiini derivaatide bioloogilist aktiivsust nendele retseptoritele.

Töö teoreetilises osas anti ülevaade signaaliülekande mehhanismidest G-valkudega seotud retseptorite kaudu, samuti erinevate dopamiini retseptorite alatüüpide bioloogilisest rollist ning erinevatest meetoditest tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) määramiseks. Eksperimentaalses osas kirjeldati HEK293 rakuliini kasvatamist, rekombinantse sensorvalgu ekspresseerimist ning funktsionaalsete katsete teostamist elus rakkudel.

Käesolevas töös seati sisse fluorestsentsil põhinevat meetod cAMP määramiseks elus rakkudes, millega on võimalik uurida nii  $G_s$ - kui ka  $G_i$ -seotud retseptorsüsteeme. Pärast sensori kohandamist D2 ja D3 retseptoritele uuriti ka 1-asendatud apomorfiini derivaatide mõju retseptoritele ning võrreldi neid nii meie laboris kui ka kirjanduses avaldatud tulemustega. Olulise arenguna saadi usaldusväärsed tulemused ka D3 retseptori alatüübile, mis eelnevate meie laboris kasutatud meetoditega ei olnud osutunud võimalikuks.

Kõik uuritud apomorfiini derivaadid osutusid apomorfiiniga võrreldes täisagonistideks ning kõigi ühendite afiinsus D2 ja D3 retseptoritele oli vähemalt alla mikromolaarse. Kuigi sünteesitud ühendid vähendasid selektiivsust D1 retseptorile võrreldes D2 ja D3 retseptoritega, siis märkimisväärset selektiivsust D2 ja D3 retseptoritele ei leitud. Saadud tulemused annavad väärtuslikku informatsiooni uute selektiivsete ühendite edasiarenduseks tulevikus.

## SUMMARY

Dopamine receptors represent a physiologically important family of G-protein coupled receptors involved in signal transduction between cells. Malfunctioning of these receptors can cause several severe illnesses, e.g. Schizophrenia, PD, etc. The aim of the present study was to adapt an Epac-based biosensor “Epac2-camps” for studies of  $G_i$  coupled dopamine D2 and D3 receptor subtypes. Additionally, biological activity of 1-substituted apomorphine derivatives, synthesized in the University of Debrecen, was investigated on both of these receptor subtypes.

In the theoretical part of the thesis, signal transduction mechanisms involving G-protein coupled receptors, the physiological role of different dopamine receptor subtypes and several methods for determining cyclic adenosine monophosphate (cAMP) were reviewed. In the experimental part, the maintenance of HEK293 cell line, the expression of the recombinant sensor protein and the functional experiments on live cells were described.

In the present study, a fluorescence based method for determination of cAMP in live cells was implemented, that allows investigating both  $G_s$ - and  $G_i$ -coupled receptor systems. After adapting the sensor to the D2 and D3 receptors, the effects of 1-substituted apomorphine derivatives were measured and compared to former data obtained with previous methods from our laboratory and from the literature. Importantly, reliable results were obtained for the D3 receptor subtype, which had not been possible using previous methods available in our laboratory.

All of the tested apomorphine derivatives behaved as full agonists compared to apomorphine itself and showed at least submicromolar affinity for D2 and D3 receptors. Although the synthesized compounds decreased the selectivity for D1R compared to D2 and D3 receptors, there was only a slight effect on the selectivity for D2 and D3 receptors. The obtained results give valuable information for the development of new selective compounds in the future.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin südamest tänada kõiki, kes selle töö valmimisel mulle abiks olid. Eriti soovin tänada oma juhendajat Olga Mazinat, kes on alati leidnud aega ja energiat minu küsimustele vastata ning kes on oma positiivse ja innustava suhtumisega minusse väga palju motivatsiooni süstinud. Samuti tahan tänada Reet Reinart-Okugbenit, kes on alati igakülselt abiks olnud ja nõu andnud. Tänan ka kõiki teisi laborikaaslasi, kellega on saadud vestelda nii teaduslikel kui ka vähem teaduslikel teemadel.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R. (2011) The psychology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **63**, 1, 182-217.
- Carlsson, J., Coleman, R. G., Setola, V., Irwin, J. J., Fan, H., Schlessinger, A., Sali, A., Roth, B. L., Shoichet, B. K. (2011) Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 11, 769-778.
- Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M. A., Shi, L., Hauck Newman, A., Javitch, J. A., Cherezov, V., Stevens, R. C. (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Sci. Signal.* **330**, 6007, 1091.
- Chumpradit, S., Kung, M. P., Vessotskie, J., Foulon, C., Mu, M., Kung, H. F. (1994) Iodinated 2-aminotetralins and 3-amino-1-benzopyrans: ligands for dopamine D2 and D3 receptors. *J. Med. Chem.* **37**, 24, 4245-4250.
- Cooper, J.A. Second messenger. *Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Online Academic Edition*;  
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/531531/second-messenger> viimati alla laetud 26.05.2013.
- Dürr, H., Bouas-Laurent, H. (2003) *Photochromism: Molecules and systems*. Elsevier inc.
- Fornwald, J. A., Lu, Q., Wang, D., Ames, R. S. (2007) Gene expression in mammalian cells using BacMam, a modified baculovirus system, In: *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, (David, W. M., Murhammer, D. W.), pp. 95-114. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hill, S. J., Williams, C., May, L. T. (2010) Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *Brit. J. Pharmacol.* **161**, 6, 1266-1275.
- Hu, Y. C. (2008) Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr. Gene Ther.* **8**, 1, 54-65.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J., Steegborn, C. (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J. Mol. Biol.* **362**, 623-639.

- Kimball, J.W. *BiologyPages*;  
[http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Second\\_messengers.html](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Second_messengers.html) viimati uuendatud 08.04.2011.
- Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W., & Jalink, K. (2011) A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PloS one*. **6**, 4, e19170.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., Ames, R. S., Rees, S., Romanos, M. A. (2007) Implementation of BacMam virus gene delivery technology in a drug discovery setting. *Drug Discov. Today*. **12**, 9, 396-403.
- van der Krogt, G. N., Ogink, J., Ponsioen, B., Jalink, K. (2008) A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS One*. **3**, 4, e1916.
- Maggio, R., Millan, M.J. (2009) Dopamine D2–D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 1, 100-107.
- Marinissen, M.J., Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 7, 368-376.
- Mazina, O., Reinart-Okugbeni, R., Kopanchuk, S., Rinken, A. (2012) BacMam System for FRET-Based cAMP Sensor Expression in Studies of Melanocortin MC1 Receptor Activation. *J. Biomol. Screen.* **17**, 8, 1096-1101.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Psychol. Rev.* **78**, 1, 189-225.
- Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., Lohse, M.J. (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* **279**, 36, 37215-37218.
- Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. (2006) Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Psychology*. **21**, 86-92.
- Pavan, B., Biondi, C., Dalpiaz, A. (2009) Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov. Today*. **14**, 19-20, 982-991.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W. H., Bos, J. L., Jalink, K. (2004) Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* **5**, 12, 1176-1180.

- Rankin, M.L., Hazelwood, L.A., Free, R.B., Namkung, Y., Rex, E.B., Roof, R.A., Sibley, D.R. (2010) Molecular pharmacology of the dopamine receptors, In: *Dopamine Handbook*, (Iversen, L.L., Dunnett, S.B., Iversen, S.D., Bjorklund, A. eds), pp. 63–87. Oxford University Press, New York.
- Reinart-Okugbeni, R., Ausmees, K., Kriis, K., Werner, F., Rinken, A., Kanger, T. (2012) Chemoenzymatic synthesis and evaluation of 3-azabicyclo [3.2. 0] heptane derivatives as dopaminergic ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **55**, 255-261.
- Reinart-Okugbeni, R., Vonk, A., Uustare, A., Zsuzsanna, G., Attila, S., Rinken, A. 1-substituted apomorphines as potent dopamine agonists. *Bioorgan. Med. Chem.* Avaldamiseks vastu võetud 08.05.2013.
- Rondou, P., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K. (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 12, 1971-1986.
- Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., Price, D. L. (2012) *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*, 8th ed. Elsevier inc.
- Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., Gross, C. (2006) The Dopamine D3 Receptor: A Therapeutic Target for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurol. Disord.-Dr.* **5**, 1, 25-43.
- Usiello, A., Baik, J.-H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., Borrelli, E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature.* **408**, 6809, 199-203.
- Vonk, A., Reinart, R., Rinken, A. (2008) Modulation of adenylyl cyclase activity in rat striatal homogenate by dopaminergic receptors. *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 1, 63-70.
- Wagh, V.D., Patil, P.N., Surana, S.J., Wagh, K.V. (2012) Forskolin: Upcoming antiglaucoma molecule. *J. Postgrad. Med.* **58**, 3, 199-202.
- Wikimedia Commons. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Activatoin-Adenylate\\_cyclase-outlined.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Activatoin-Adenylate_cyclase-outlined.svg) viimati alla laetud 26.05.2013.
- Williams, C. (2004) cAMP detection methods in HTS: Selecting the best from the rest. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 2, 125-135.
- Wu, G. (2010) *Assay Development: Fundamentals and Practices*. John Wiley & Sons, pp 265-269.

- Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., Pozzan, T. (2000) A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 1, 25-29.
- Zhang, A., Zhang, Y., Branfman, A. R., Baldessarini, R. J., Neumeyer, J. L. (2007) Advances in development of dopaminergic aporphinoids. *J. Med. Chem.* **50**, 2, 171-181.
- Zhang, R., Xie, X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 3, 372-384.



**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina

Juuli Nõges  
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 28.07.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) biosensori kohandamine  $G_i$ -seotud retseptorite ligandide iseloomustamiseks,  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on

Olga Mazina,  
(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2013**